

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE
DU DÉVELOPPEMENT INDUSTRIEL
ET SCIENTIFIQUE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

①⑪ 8.298 M

BREVET SPÉCIAL DE MÉDICAMENT

- ②① N° du procès verbal de dépôt 170.887 - Paris.
- ②② Date de dépôt 22 octobre 1968, à 16 h 3 mn.
Date de l'arrêté de délivrance 16 novembre 1970.
Bulletin Officiel de la Propriété Industrielle.
« Brevets spéciaux de médicaments » 28 décembre 1970 (n° 52).
- ⑤① Classification internationale A 61 k/C 07 c.
- ⑤④ Nouveaux dérivés de l'acide 2,3-dihydroxytéréphtalique.
- ⑦② Invention de :
- ⑦① Déposant : Société dite : C.H. BOEHRINGER SÖHN, résidant en République Fédérale d'Allemagne.

Mandataire : Plasseraud, Devant, Gutmann, Jacquelin, Lemoine.

③⑩ Priorité conventionnelle :

③③ ③② ③① *Brevet additionnel déposé en République Fédérale d'Allemagne le 20 juillet 1967, n° B 93.577 (P 16 43 632.1) au nom de la demanderesse.*

Brevet résultant de la division de la demande de certificat d'addition n° PV 160.141 déposée le 22 juillet 1968.

Vente des fascicules à l'IMPRIMERIE NATIONALE, 27, rue de la Convention - PARIS (15°)

L'invention a pour objet des composés de formule générale :



10 qui présentent d'intéressantes propriétés antiphlogistiques, analgésiques et antipyrétiques, ainsi que, le cas échéant, leurs sels d'addition avec les acides non toxiques et pharmaceutiquement acceptables.

Dans la formule susindiquée et dans ce qui suit, R_1 , R_2 et R_6 ont les significations suivantes :

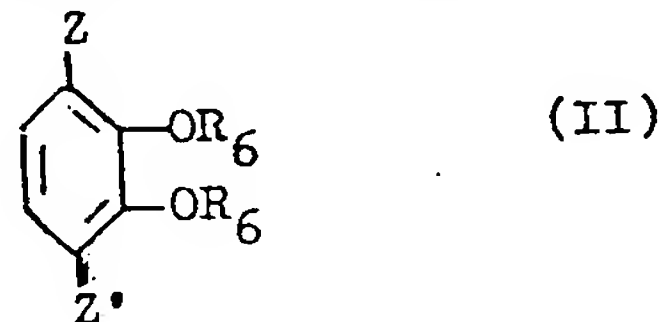
R_1 et R_2 , qui peuvent être identiques ou différents, représentent le groupe amino, le groupe $-NHR_3$, R_3 désignant un radical aliphatique inférieur, le cas échéant non-saturé, un radical aliphatique substitué par un groupe hydroxy, amino, méthylamino ou diméthylamino, le groupe hydroxy, un groupe alcoxy ou l'un des groupes $-CH_2COOH$, $-CH_2COO$ -cation, $-(CH_2)_n$ (n = 1 ou 2), ou ils représentent le groupe $-NR_4R_5$, R_4 désignant un radical alcoyle ou alcoxy inférieurs, substitués, le cas échéant, par un groupe hydroxy, et R_5 un radical alcoyle, substitué le cas échéant par un groupe hydroxy ou R_4 et R_5 désignant conjointement avec l'atome d'azote et, le cas échéant, avec un autre hétéro-atome un noyau penta- ou hexagonal saturé ou non saturé ;

25 R_1 et R_2 peuvent représenter en outre le groupe $-O-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$; l'un des radicaux R_1 et R_2 peut représenter également le groupe hydroxy ou le groupe $-O$ -cation ;

30 R_6 représente un atome d'hydrogène, le radical benzyle ou un radical aliphatique rectiligne ou ramifié, saturé ou non-saturé, interrompu, le cas échéant, par un atome d'oxygène et comportant jusqu'à 8 atomes de carbone.

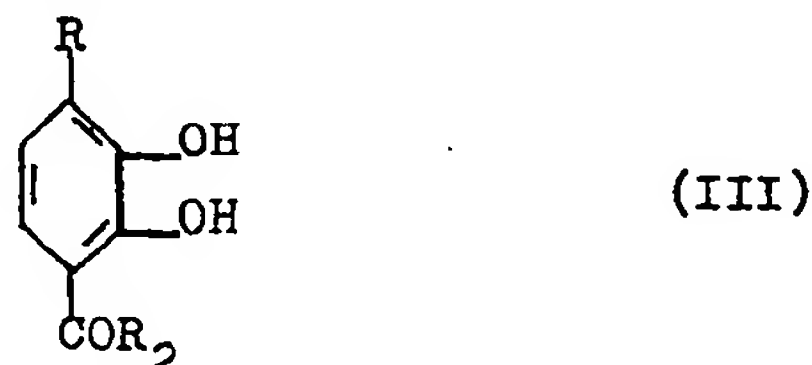
On fabrique les composés de formule I selon les procédés habituels parmi lesquels les suivants se sont avérés particulièrement intéressants :

35 1) On fabrique les composés de formule I, dans laquelle l'un des radicaux R_1 ou R_2 représente un groupe hydroxy ou le groupe $-O$ -cation, en faisant réagir avec de l'ammoniaque ou avec des composés aminés NH_2R_3 , NHR_4R_5 ou $HO(CH_2)_2-N(CH_3)_2$ correspondants, après une hydrolyse partielle et le cas échéant par étapes, un dérivé de l'acide 2,3-dihydroxy-téréphtalique de formule générale :



dans laquelle Z et Z', qui peuvent être identiques ou différents, désignent des groupements ester ou chlorure d'acide carboxylique ou d'autres dérivés carboxyliques, utilisés habituellement pour la réaction avec de l'ammoniaque ou avec des composés aminés.

5 2) On éthérifie des composés de formule générale :



10

dans laquelle R désigne le radical $-\text{COR}_1$ ou un radical convertible en $-\text{COR}_1$, en particulier un groupement ester d'acide carboxylique, avec des composés de formule $\text{R}_6'\text{X}$, dans laquelle R_6' a la même signification que R_6 , exceptée celle d'un atome d'hydrogène et dans laquelle X désigne un radical facilement éliminable sous forme d'anion, par exemple un atome de chlore ou de brome ou un radical acide sulfonique, et on convertit ensuite, si besoin est, le radical R en le groupe $-\text{COR}_1$, en faisant réagir le produit de réaction avec de l'ammoniaque ou avec un composé aminé correspondant ou en l'hydrolysant le cas échéant pour former le groupe carboxyle.

15

20

Ce procédé sert à la fabrication de ceux des composés de formule I dans lesquels R_6 a l'une des significations susindiquées, exceptée celle d'un atome d'hydrogène, et dans lesquels R_1 et R_2 désignent par ailleurs de préférence le groupe amino ou un groupe amino substitué par un radical alcoyle inférieur.

25

Dans la mesure où les composés de formule I ont une réaction basique, on les convertit finalement, si on le désire, par les techniques habituelles en leurs sels d'addition avec des acides.

On prépare les produits initiaux pour les susdits dérivés suivant les modes opératoires habituels.

30

On produit par exemple les composés de formule II, pas encore décrits jusqu'à présent, dans lesquels les radicaux R_6 ne désignent pas des atomes d'hydrogène, à partir d'un ester de l'acide 2,3-dihydroxy-téréphtalique, comme le 2,3-dihydroxytéréphtalate de diméthyle. On commence par éthérifier l'ester. Si on ne désire pas mettre en oeuvre les produits résultant de cette réaction tels quels, on peut hydrolyser l'un des groupes ester ou tous les deux et convertir ensuite les acides carboxyliques formés en des dérivés particulièrement réactifs, par exemple en leurs chlorures ou en leurs esters activés.

35

On peut préparer les composés pas encore décrits jusqu'à présent de formule III à partir de l'acide 2,3-dihydroxy-téréphtalique. On convertit l'un de ses groupes carboxyle ou tous les deux en d'autres

40

groupes fonctionnels, par exemple en chlorure d'acide ou en carboxylate d'alcoyle, qu'on fait réagir ensuite avec de l'ammoniaque ou avec des composés aminés correspondants.

Les exemples suivants illustreront l'invention avec plus de détails.

5 Exemple 1.- Le 2,3-diméthoxytéréphtaloyl-diamide.

On fait tomber, goutte à goutte et à la température de -10°C , 126g de dichlorure d'acide 2,3-diméthoxytéréphtalique dissous dans 50 ml d'éther, dans un mélange de 100 ml d'ammoniac liquide et de 200 ml de méthanol. Quand la température a atteint l'ambiante, on évapore dans un bain-marie jusqu'à siccité, on traite le résidu avec 200 ml d'eau et on l'essore. On recristallise les cristaux dans 1100 ml d'eau. Dans la solution-mère, on récupère encore une deuxième fraction par concentration. Rendement total: 98,5g (92% de la théorie) ; P.F. 205°C .

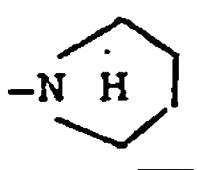
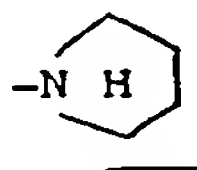

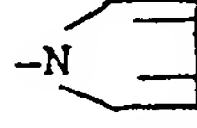
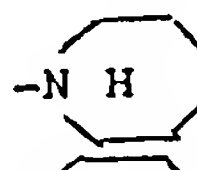
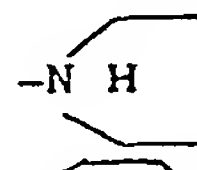
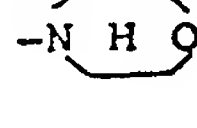
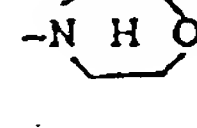
D'une façon analogue, on fabrique :

15 le 2,3-diméthoxytéréphtaloyl-bis-diisopropylamide à partir de dichlorure d'acide 2,3-diméthoxytéréphtalique et de diisopropylamine dans du chloroforme. Rendement 72 % de la théorie ; P.F. 251°C ,

le 2,3-diméthoxytéréphtaloyl-bis-allylamide à partir de dichlorure d'acide 2,3-diméthoxytéréphtalique et d'allylamine dans du chloroforme.

20 Rendement 55 % de la théorie ; P.F. $67-69^{\circ}\text{C}$.

Les composés indiqués dans le Tableau 1 ci-dessous :

n°	R ₁	R ₂	R ₆	Rendement (% de la théorie)	P.F. ($^{\circ}\text{C}$)
1	$-\text{NH}-\text{CH}_3$	$-\text{NH}-\text{CH}_3$	$-\text{CH}_3$	50	187-188
2	$-\text{NH}-\text{C}_2\text{H}_5$	$-\text{NH}-\text{C}_2\text{H}_5$	$-\text{CH}_3$	55	118
3	$-\text{NH}(\text{CH}_2)_2-\text{N} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{N} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$-\text{CH}_3$	32	196-197 chlorhydrate
4	$-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COONa}$	$-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COONa}$	$-\text{CH}_3$	60	222
5	$-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	$-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	$-\text{CH}_3$	60	142-143
6	$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_5$	$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{C}_6\text{H}_5$	$-\text{CH}_3$	50	108
7	$-\text{N} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$-\text{N} \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$-\text{CH}_3$	50	117
8	$-\text{N} \begin{array}{l} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$	$-\text{N} \begin{array}{l} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array}$	$-\text{CH}_3$	45	110
9			$-\text{CH}_3$	45	137-138
10			$-\text{CH}_3$	40	131
11			$-\text{CH}_3$	48	120
12			$-\text{CH}_3$	54	190-191

13				45	178-180 chlorhydrate
14				63	168
15				70	110-112
16				50	263 acide
17				74	102
18				61	101-103
19				65	115-116
20				56	93
21				62	115-116
22				37	146
23				53	130
24				57	76
25				41	97-98
26				56	131-133
27				60	171-172
28				55	185-186
29				22	147-148
30				51	129-130

Exemple 2.- Le 2,3-di-n-butoxytéréphthaloyl-bis-monométhylamide.




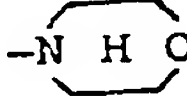
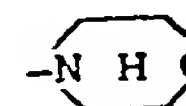
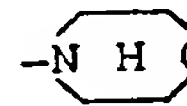
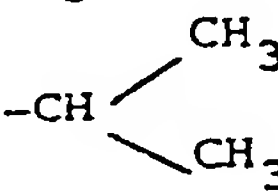
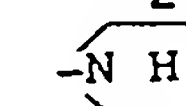
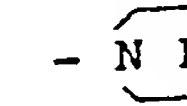
On introduit d'abord, à la température de 110°C, 19,5 g de carbonate de potassium dans une solution de 15,0 g de 2,3-dioxytéréphthaloyl-bis-monométhylamide dans 100 ml de diméthylformamide. Au bout de 15 minutes, on ajoute à ce mélange, goutte à goutte et en agitant, 65,0 g de bromure de n-butyle et on continue à agiter durant 2,5 heures à 110°C. On enlève ensuite le diméthylformamide sous vide et on délaie le résidu à froid avec une solution de 4 g d'hydroxyde de sodium dans 200 ml d'eau.

Après essorage, on dissout à chaud dans 140 ml d'isopropanol, on ajoute 250 ml d'eau chaude et on filtre sur du charbon actif. Rendement : 16 g (72% de la théorie) ; P.F. 162-163°C.

D'une façon analogue, on fabrique les composés indiqués dans le tableau 2 ci-dessous :

Tableau 2

15

n°	R ₁	R ₂	R ₆	Rendement (% de la théorie)	P.F. (°C)
20	31 -NH ₂	-NH ₂	-CH ₃	50	205
	32 		-CH ₃	41	190-191
	33 -NH ₂	-NH ₂	-C ₂ H ₅	56	245
25	34 		-C ₂ H ₅	50	152
	35 -NH ₂	-NH ₂	-C ₃ H ₇	70	236
	36 -NH-CH ₃	-NH-CH ₃	-C ₃ H ₇	58	160
30	37 		-C ₃ H ₇	45	169
	38 -NH ₂	-NH ₂		55	251
	39 -NH ₂	-NH ₂	-CH ₂ -CH=CH ₂	50	205
35	40 -NH-CH ₃	-NH-CH ₃	-CH ₂ -CH-CH ₂	54	129-130
	41 -NH ₂	-NH ₂	-C ₄ H ₉	70	221
	42 -NH-CH ₃	-NH-CH ₃	-C ₄ H ₉	72	162-163
	43 -NH ₂	-NH ₂	-C ₈ H ₁₇	60	178-179
40	44 		-C ₈ H ₁₇	55	131
	45 -NH ₂	-NH ₂	-CH ₂ -C ₆ H ₅	22	224-225
	46 -NH ₂	-NH ₂	-C ₂ H ₄ -O-CH ₃	37	185-187

18.7.1968 - 5

0730-68

Ha/GK/Slp.

Exemple 3.- Le 2,3-diméthoxytéréphtaloyl-diamide.

On agite, durant 60 heures et à la température ambiante, 10 g de 2,3-diméthoxytéréphtalate de diméthyle avec 40 ml d'ammoniaque concentrée. Ensuite, on essore et on recristallise dans de l'eau.
5 Rendement : 7,5 g (85% de la théorie) ; P.F. 205°C.

Exemple 4.- Le 2,3-diméthoxytéréphtaloyl-bis-monoéthanolamide.

On chauffe un mélange de 20 g de 2,3-dioxytéréphtalate de diméthyle et de 50 ml de monoéthanolamine durant 4 heures à 120°C. On évapore l'excès d'éthanolamine sous vide et on dissout le résidu dans
10 100 ml d'eau chaude ; on acidifie avec de l'acide chlorhydrique, on refroidit et on essore. Recristallisation dans 325 ml d'eau. Rendement : 20,7 g (82% de la théorie) ; P.F. 221°C.

Exemple 5.- L'acide 2,3-diméthoxy-4-carbamoyl-benzoïque.

a) On dissout, en chauffant avec reflux, 80 g de 2,3-diméthoxytéréphtalate de diméthyle dans un mélange de 450 ml de méthanol et de
15 450 ml de tétrachlorure de carbone. On ajoute ensuite, goutte à goutte et dans l'espace de 3 heures, une solution de 12,8 g d'hydroxyde de sodium dans 260 ml de méthanol et 26 ml d'eau, on poursuit l'ébullition avec reflux durant 1 heure, on laisse refroidir et on essore.
20 On évapore le filtrat sous vide jusqu'à siccité et on dissout le résidu dans de l'eau. On extrait la solution trouble avec de l'éther et on acidifie la phase aqueuse avec de l'acide chlorhydrique dilué. On reprend l'huile, qui se sépare alors, dans de l'éther, on sèche la phase étherée et on l'évapore jusqu'à siccité. On triture le résidu avec un mélange acétate d'éthyle/éther de pétrole et on sépare
25 les cristaux formés (4 g) par essorage. On évapore le filtrat jusqu'à siccité et on recristallise le résidu dans un mélange de 150 ml de cyclohexane et de 100 ml d'acétate d'éthyle. Rendement en 2,3-diméthoxytéréphtalate de monométhyle : 36 g (48% de la théorie) ; P.F.
30 75-78°C.

b) on dissout 31 g de 2,3-diméthoxytéréphtalate de monométhyle dans 100 ml d'ammoniaque concentrée et on laisse reposer la solution durant deux jours à la température ambiante. Ensuite, on enlève l'excès d'ammoniaque sous vide, on acidifie le résidu avec de l'acide
35 chlorhydrique dilué, on essore, on lave avec de l'eau, on sèche et on recristallise dans 350 ml d'eau. Rendement : 25 g (86% de la théorie) d'acide 2,3-diméthoxy-4-carbamoyl-benzoïque; P.F. 201°C.

Exemple 6.- Le 2,3-diméthoxy-4-carbamoyl-benzoylmorpholide.

On dissout, en agitant, 28 g de 2,3-diméthoxytéréphtalate de monométhyle selon l'exemple 5a) dans un mélange de 120 ml de chloroforme absolu et de 12 g de triéthylamine. A la température ambiante, on ajoute ensuite 12,7 g de chloroformiate d'éthyle et on laisse reposer durant 0,5 heure. Après ce laps de temps, on ajoute 10,3 ml de morpholine, on homogénéise en secouant et on laisse reposer durant la
40

18.7.1968 - 5
0730-68
Ha/GK/Slp.

nuit, puis on extrait la solution chloroformique 2 fois avec de l'eau, on la sèche et on l'évapore jusqu'à siccité. Le résidu consiste en 31 g d'une huile, sur laquelle on verse 100 ml d'ammoniaque concentrée. On agite le mélange durant la nuit, on essore et on recristallise dans 100 ml de méthanol. Rendement : 12 g de 2,3-diméthoxy-4-carbamoyl-benzoylmorpholide (35% de la théorie) ; P.F. 172-174°C.

Exemple 7.- L'acide 2,3-diméthoxy-4-carbamoyl-hippurique.

a) A 30 g de 2,3-diméthoxytéréphtalate de monométhyle (selon l'exemple 5a), on ajoute 100 ml de chlorure de thionyle et on chauffe le mélange avec reflux durant 1 heure. Ensuite, on évapore la solution claire jusqu'à siccité. Le résidu consiste en 35 g d'une huile jaune.

b) On dissout cette huile dans 120 ml de tétrahydrofurane puis, on ajoute goutte à goutte, en agitant et à la température ambiante, une solution de 10,3 g de glycine dans 69 ml d'hydroxyde de sodium 2 N. L'addition terminée, on continue à agiter durant 1 heure à la température ambiante, on évapore sous vide jusqu'à siccité et on lave le résidu avec très peu d'eau. Sur les cristaux encore humides, on verse 150 ml d'ammoniaque concentrée, on les met en solution en secouant le mélange et on laisse reposer durant trois jours à la température ambiante. Après ce laps de temps, on enlève l'excès d'ammoniaque sous vide, on acidifie le résidu avec de l'acide chlorhydrique dilué, on essore et on recristallise le produit de réaction encore humide dans 60 ml de méthanol. Rendement en acide 2,3-diméthoxy-4-carbamoyl-hippurique : 18 g (52% de la théorie) ; P.F. 185°C.

Comme déjà indiqué les composés selon l'invention sont d'un grand intérêt pharmacologique ; ils présentent notamment des effets antiphlogistiques, analgésiques et antipyrétiques remarquables. On peut les utiliser seuls ou en combinaisons entre eux ou avec d'autres substances actives connues, sous la forme des préparations galéniques usuelles. Des formes d'administration appropriées sont par exemple des tablettes, dragées, capsules, suppositoires, solutions, potions et granulés. On fabrique ces différentes préparations à l'aide d'excipients, de désintégrants, de liants, de produits aromatisants et, le cas échéant, de produits pour l'obtention d'un effet de dépôt, selon les techniques de fabrication habituelles.

On utilise les substances actives selon l'invention en tant qu'antiphlogistiques chez l'homme à doses journalières de 300 à 1500 mg, de préférence sous forme de trois doses unitaires de 100 à 500 mg.

Parmi les composés selon l'invention, il convient de signaler en particulier :

le 2,3-diméthoxytéréphtalamide, P.F. 205°C (A) ;

le 2,3-diéthoxytéréphtalamide, P.F. 245°C (B) .

5 On a déterminé l'effet antiphlogistique, en essayant l'action inhibitrice sur l'oedème à la levure chez le rat.

Dans cet essai, les substances selon l'invention s'avèrent supérieures à la butazolidine (3,5-dioxo-1,2-diphényl-4-n-butyl-pyrazolidine).

10	Composé	Effet antiphlogistique Butazolidine = 1	DL ₅₀ orale mg/kg chez la souris
	A	10	740
	B	3	560

15 Ci-après on donne deux exemples de formulations pharmaceutiques .

Tablettes :

Parties en poids

2,3-diméthoxytéréphtalamide	100,0
amidon de maïs	149,0
phosphate de calcium	250,0
20 stéarate de magnésium	1,0
	500,0

On mélange les constituants intimement ; on granule le mélange de façon habituelle et on transforme le granulat par compression en tablettes de 500 mg chacune.

25 Capsules de gélatine :

Parties en poids

2,3-diéthoxytéréphtalamide	300,0
amidon de maïs	200,0
	500,0

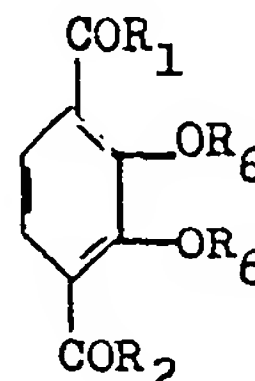
30 On mélange les constituants intimement et on introduit le mélange dans des capsules de gélatine à raison de 500 mg par capsule.

R E S U M E

L'invention a pour objet :

1°) De nouveaux agents thérapeutiques présentant d'intéressantes propriétés antiphlogistiques, analgésiques et antipyrétiques et dont

35 la formule générale s'écrit :



40

dans laquelle :

R_1 et R_2 , qui peuvent être identiques ou différents représentent le groupe amino, le groupe $-NHR_3$, R_3 désignant un radical aliphatique inférieur, le cas échéant non-saturé, un radical aliphatique substitué par un groupe hydroxy, amino, méthylamino ou diméthylamino, le groupe hydroxy, un groupe alcoxy ou l'un des groupes $-CH_2COOH$, $-CH_2COO$ -cation, $-(CH_2)_n-\langle \text{benzene ring} \rangle$ ($n = 1$ ou 2), ou ils représentent le groupe $-NR_4R_5$, R_4 désignant un radical alcoyle ou alcoxy inférieurs, substitués, le cas échéant, par un groupe hydroxy, et R_5 un radical alcoyle, substitué le cas échéant par un groupe hydroxy ou R_4 et R_5 désignant conjointement avec l'atome d'azote et, le cas échéant, avec un autre hétéro-atome un noyau penta- ou hexagonal saturé ou non saturé ;

R_1 et R_2 peuvent représenter en outre le groupe $-O-(CH_2)_2-N(CH_3)_2$; l'un des radicaux R_1 et R_2 peut représenter également le groupe hydroxy ou le groupe $-O$ -cation ;

R_6 représente un atome d'hydrogène, le radical benzyle ou un radical aliphatique rectiligne ou ramifié, saturé ou non-saturé, interrompu, le cas échéant, par un atome d'oxygène et comportant jusqu'à 8 atomes de carbone ;

2°) le 2,3-diméthoxytéréphthalamide, P.F. 205°C (A) ;

3°) le 2,3-diéthoxytéréphthalamide, P.F. 245°C (B) .

4°) Les sels d'addition des susdits composés avec des acides physiologiquement supportables.

5°) Les médicaments administrés sous la forme de tablettes, dragées, capsules, suppositoires, solutions, potions, granulés, etc., et contenant, outre des adjuvants et excipients, en tant que substance active au moins l'un des composés susdits associé, le cas échéant, à d'autres substances actives connues, la dose posologique journalière en la substance active pour l'obtention d'un effet antiphlogistique chez l'homme étant de 300 à 1500 mg, administrée, de préférence, sous forme de trois doses unitaires de 100 à 500 mg .

6°) Une méthode de traitement d'inflammations chez l'homme par administration d'un médicament selon l'alinéa 3).

8298

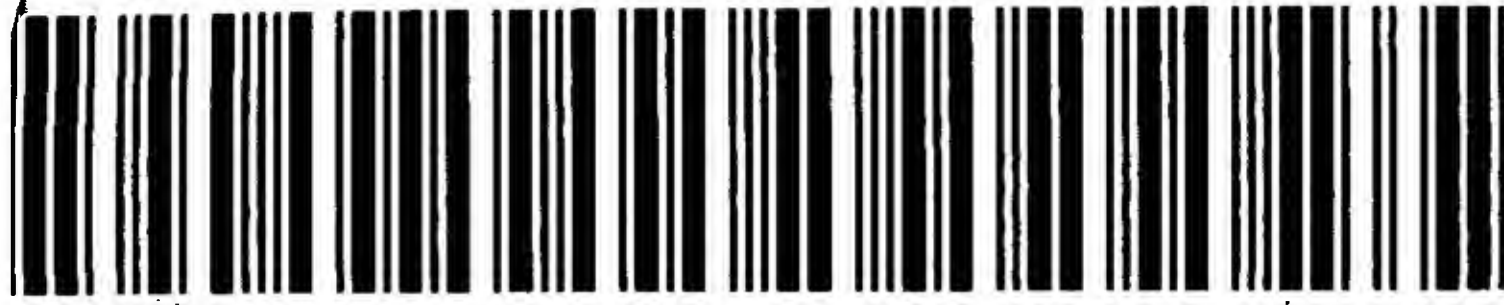
8 298 M

AVIS DOCUMENTAIRE SUR LA NOUVEAUTE

Documents susceptibles de porter atteinte à la nouveauté du médicament :

- 2è certificat d'addition n° 72 CAM au brevet français (B.S.M.) n° 1.525 M.

DS REFERENCES



☐ FOR



Terephthalamide derivatives as mimetics of the helical region of Bak peptide target Bcl-xL protein

Hang Yin and Andrew D. Hamilton*

Department of Chemistry, Yale University, PO Box 20810, New Haven, CT 06511, USA

Received 12 August 2003; accepted 15 September 2003

Abstract—A group of novel Bcl-xL/Bak antagonists, based on a terephthalamide scaffold, were designed to mimic the α -helical region of the Bak peptide. Good in vitro inhibition potencies in disrupting the Bak/Bcl-xL complex have been observed (terephthalamide 4, $K_i = 0.78 \pm 0.07 \mu\text{M}$).

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Proteins in the Bcl-2 family play a critical role in determining the fate of a cell through the process of apoptosis.¹ Many oncogenic mutations, particularly those to p53, result in defects in DNA damage-induced apoptosis through a Bcl-2 dependent mechanism.² In addition, overexpression of Bcl-2 can inhibit the potency of many currently available anticancer drugs by blocking the apoptotic pathway.³ Therefore, agents that directly mimic the death-promoting region BH3 domain of the pro-apoptotic subfamily of Bcl-2 proteins⁴ are of potential therapeutic value.

The NMR-derived structure of the Bcl-xL/Bak BH3 domain complex indicates that the Bak peptide is an amphipathic α -helix that interacts with Bcl-xL by projecting hydrophobic side chains (Val⁷⁴, Leu⁷⁸, Ile⁸¹ and Ile⁸⁵) on one face of the α helix, into a hydrophobic cleft of Bcl-xL.⁵ Several low molecular weight inhibitors of Bcl-2/Bcl-xL have been reported with the majority showing potency in the low μM range.⁶ An alternative approach for identifying inhibitors is to design synthetic scaffolds that reproduce structural features of the BH3 helix region. We have previously reported functionalized terphenyls based on 1 as mimetics of the discontinuous binding epitopes of BH3.⁷ However, the hydrophobicity of the terphenyls and their challenging syntheses prompted us to search for simpler scaffolds that could similarly mimic the side chain presentation on an α -helix. Herein, we report a group of novel

Bcl-xL/Bak antagonists based on a terephthalamide scaffold, designed to mimic the α -helical region of the Bak peptide. Using a fluorescence polarization assay, we have observed high in vitro inhibition potencies in disrupting the Bcl-xL/Bak complex and a significant improvement in water solubility relative to the terphenyl derivatives.

The goal of our design was to maintain the similarity between the arrangement of the i , $i+4$, $i+7$ side chains of an α -helix and the substituents on the 3, 2', 2'-positions on terphenyl 1,⁷ while minimizing the structural complexity and increasing the solubility of the inhibitors. This strategy of simplifying a proven *proteomimetic* was accomplished by using terephthalamide 2 as the scaffold. The flanking phenyl rings in 1 were replaced by two functionalized carboxamide groups, which also retain a planar geometry due to the restricted rotation of the amide bonds. Figures 1A and B show, respectively, superimpositions of energy-minimized 2 on 1 ($R_1 = R_2 = R_3 = \text{Me}$) with an RMS deviation of 0.34 Å and on the i , $i+4$, $i+7$ side chains of an α -helix with an RMS deviation of 1.03 Å, suggesting good stereochemical similarity between both pairs.⁸

A modular synthesis of terephthalamide derivative 4 is shown in Scheme 1. The 2-alkoxy group was introduced by *O*-alkylation and the 1-carboxylic acid was installed through Sandmeyer reaction and Stille coupling followed by Lemieux-Johnson and PDC oxidation. The amide bond formation steps were accomplished by using standard coupling conditions.

* Corresponding author. Tel.: +1-203-432-5570; fax: +1-203-432-3221; e-mail: andrew.hamilton@yale.edu

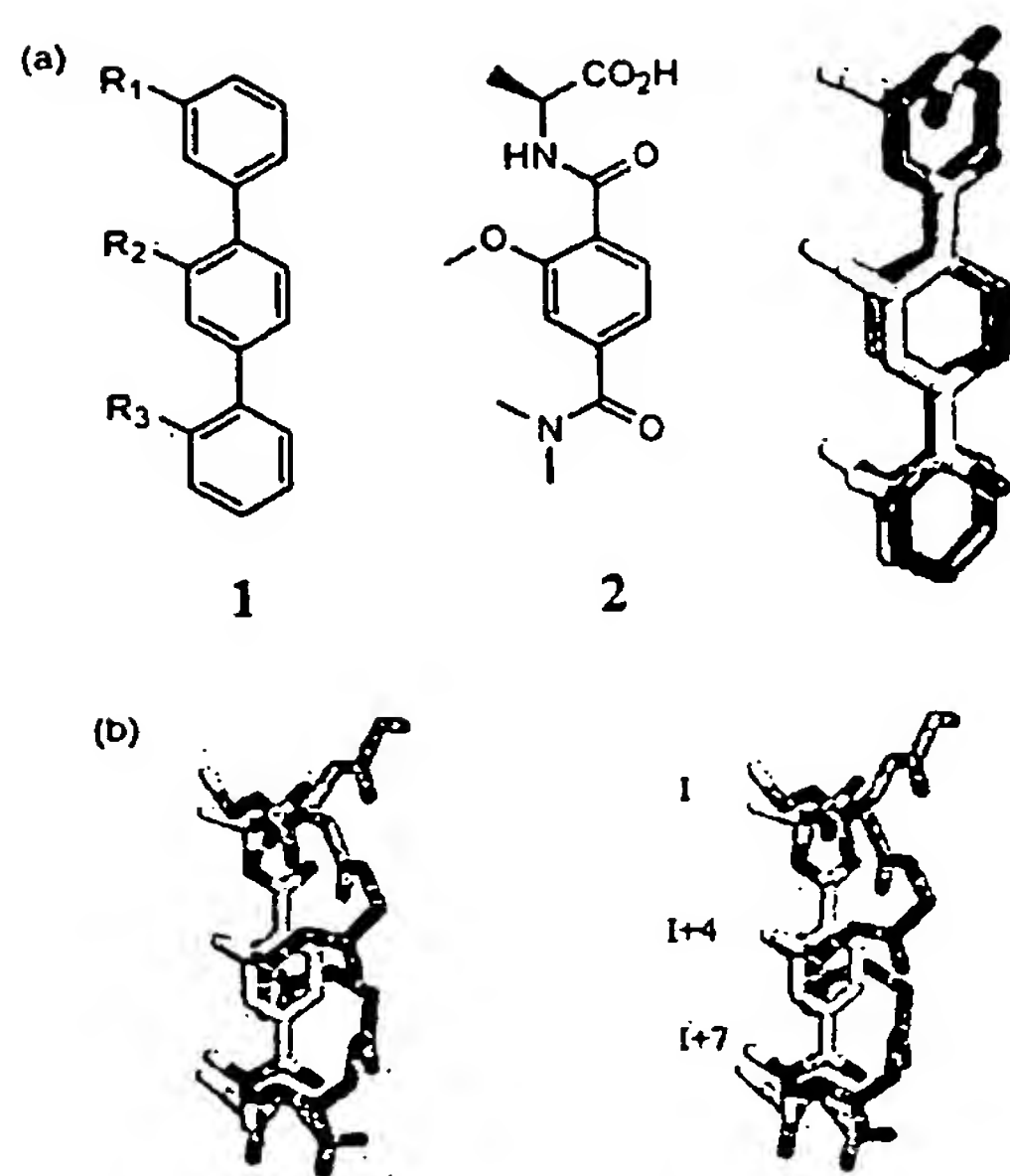


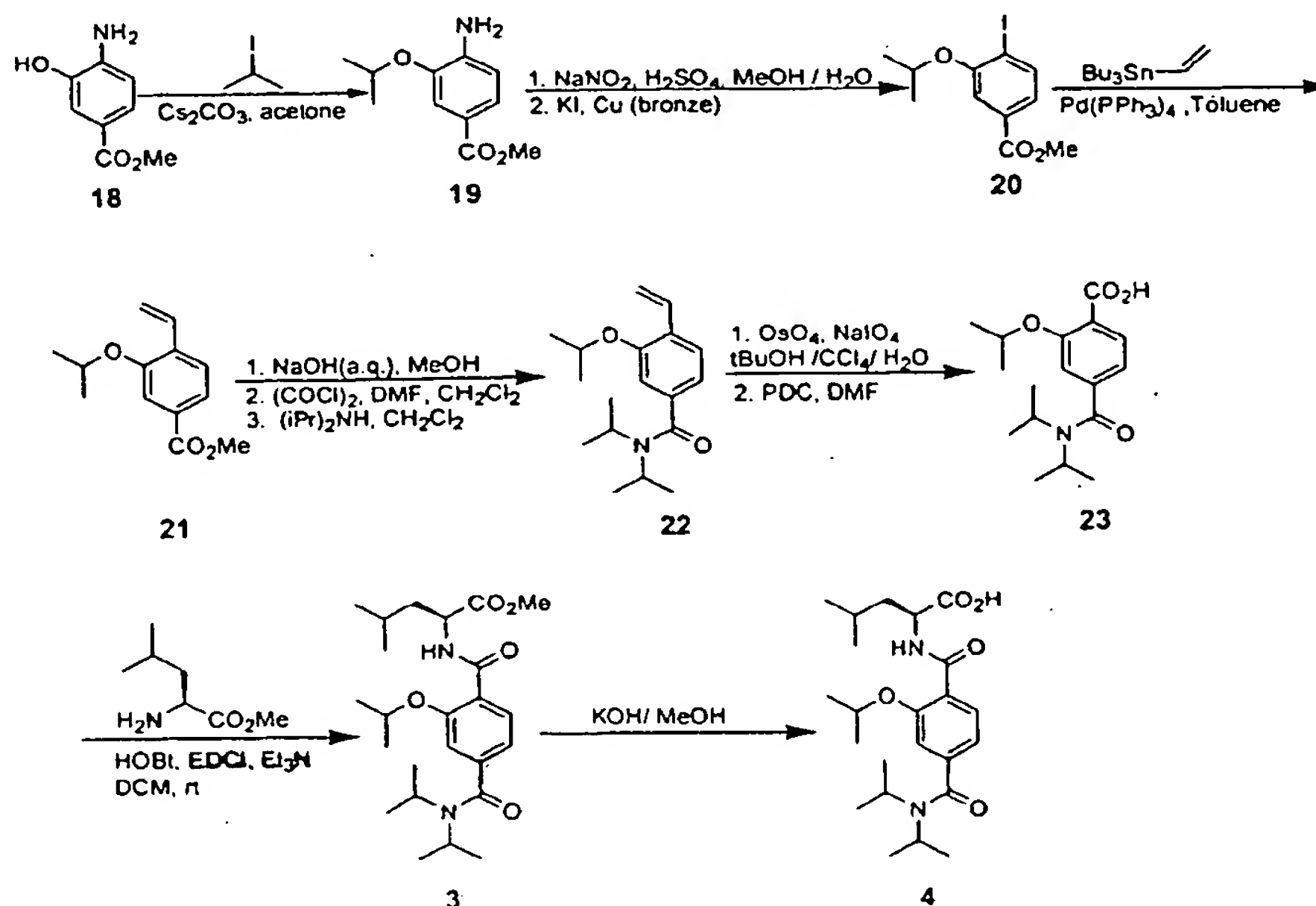
Figure 1. (A) The superimposition of terphenyl 1 on terephthalamide 2. (B) Stereo view of the superimposition of 2 on the i, i+4, i+7 positions of an α -helix.

Another conformational constraint in the molecule was imposed by an intramolecular hydrogen bond between the amide –NH and the alkoxy oxygen atom, to influence the position of the upper alkyl group (Fig. 2).⁹ The intramolecular hydrogen bond was confirmed by variable temperature NMR, which showed very little change in the amide-NH resonance ($\delta = 8.54$ ppm) on heating ($\Delta\delta = 1.54$ ppb/K) or changing concentration.¹⁰ As a comparison, 2-isopropylaminoterephthalamide 17 showed both concentration (7.36 ppm, 0.5 M in CDCl₃; 6.58 ppm, 0.05 M in CDCl₃; 6.46 ppm, 0.005 M in

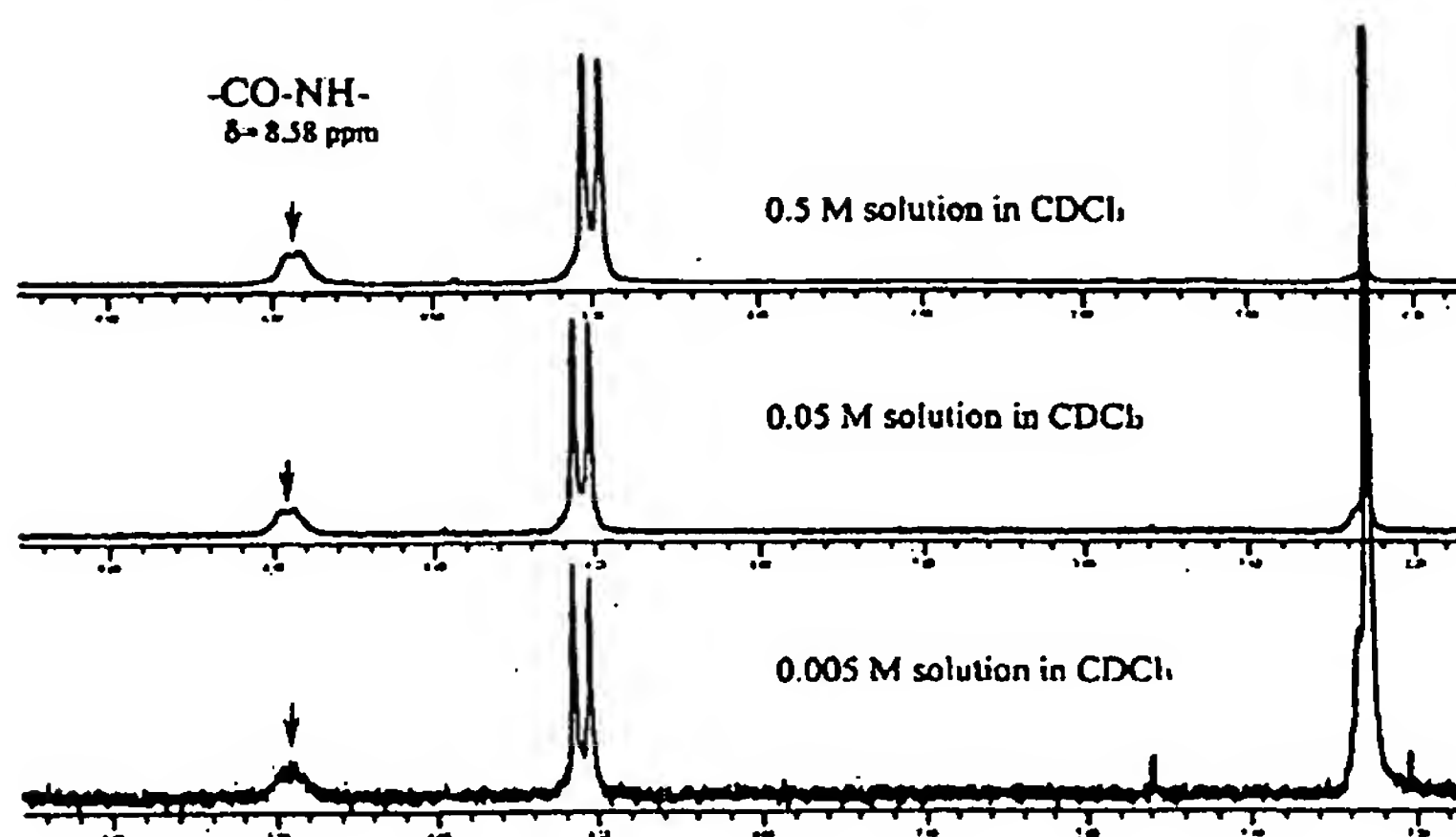
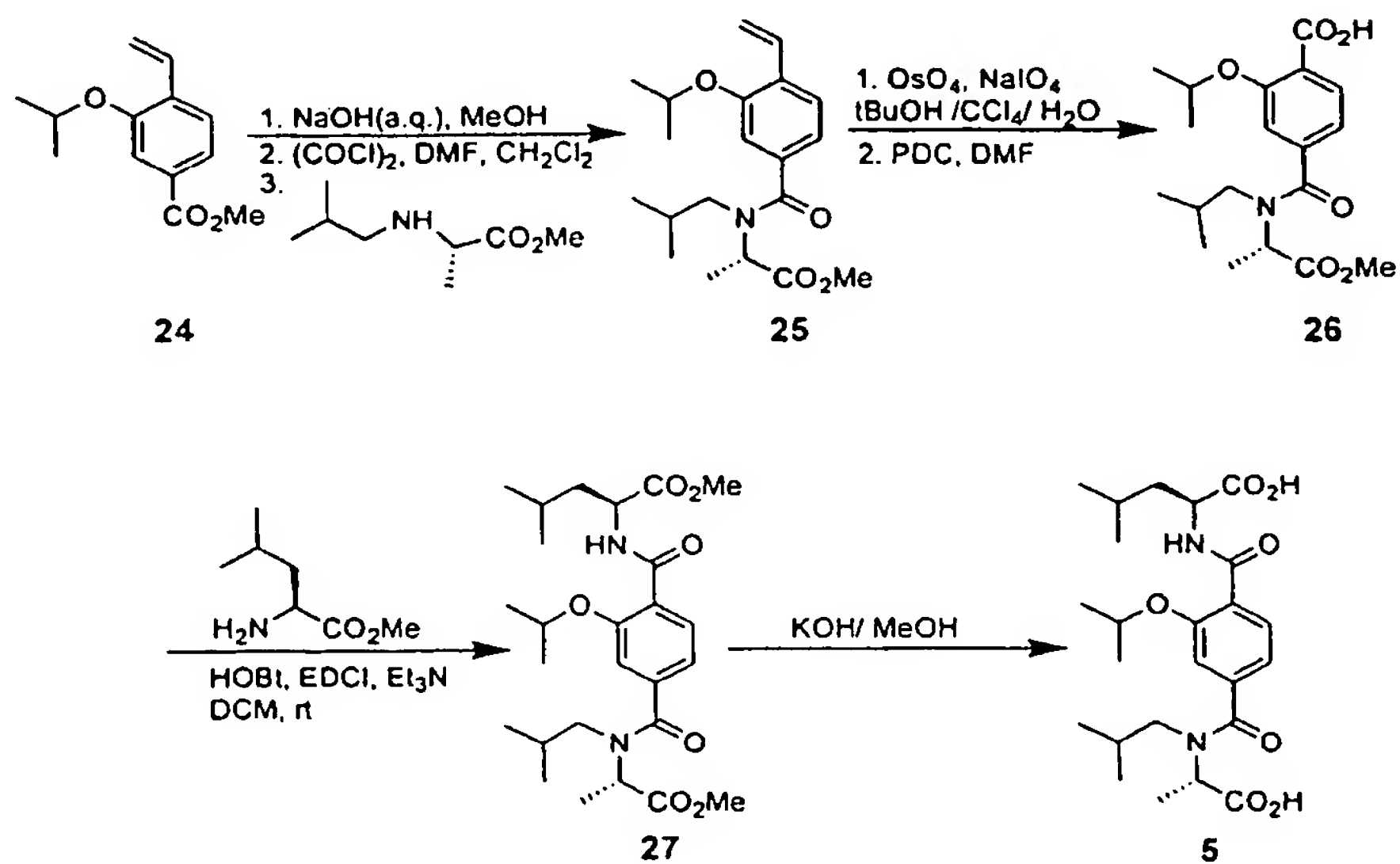
CDCl₃, 298 K) and temperature ($\Delta\delta = 5.5$ ppb/K) dependence of the aniline proton, suggesting inter- rather than intramolecular hydrogen bonding.

Two strategies were used to orient the interacting *N*-alkyl group of the lower tertiary amide into the desired *Z*-conformation. In 3, the problem was avoided by using identical substituents on the tertiary amide nitrogen. In a second series of derivatives (5, Scheme 2), steric differentiation of the substituents favored the placement of the isobutyl group in the *Z*-position (Fig. 3A). The conformation of 5 in solution was probed by ROESY and NOESY ¹H spectroscopy.¹¹ NOE cross peaks between H_b and the *ortho*-aryl protons were detected, while no significant NOE effect could be seen between H_a and the *ortho*-protons. However, correlations corresponding to the chemical exchange of H_a and H_b were observed in the ROESY experiment (Fig. 3B), which indicated there were two conformations of 5 existing in DMSO solution at 298 K. Furthermore, the signals of both H_a and H_b, which are split at room temperature, coalesced at 353 K. These combined experimental results suggest that both *Z*- and *E*-amide conformations are present with the *Z*-conformation being favored by 72% (from NMR integration), and by 8.01 kJ/mole in water solution (from MM2 energy minimization using MacroModel). The consequence of these constraints is that in low energy, accessible conformations of 5, the three substituents project from one face of the terephthalamide scaffold in a manner analogous to the terphenyl helix mimetics (e.g., Fig. 1A).⁷

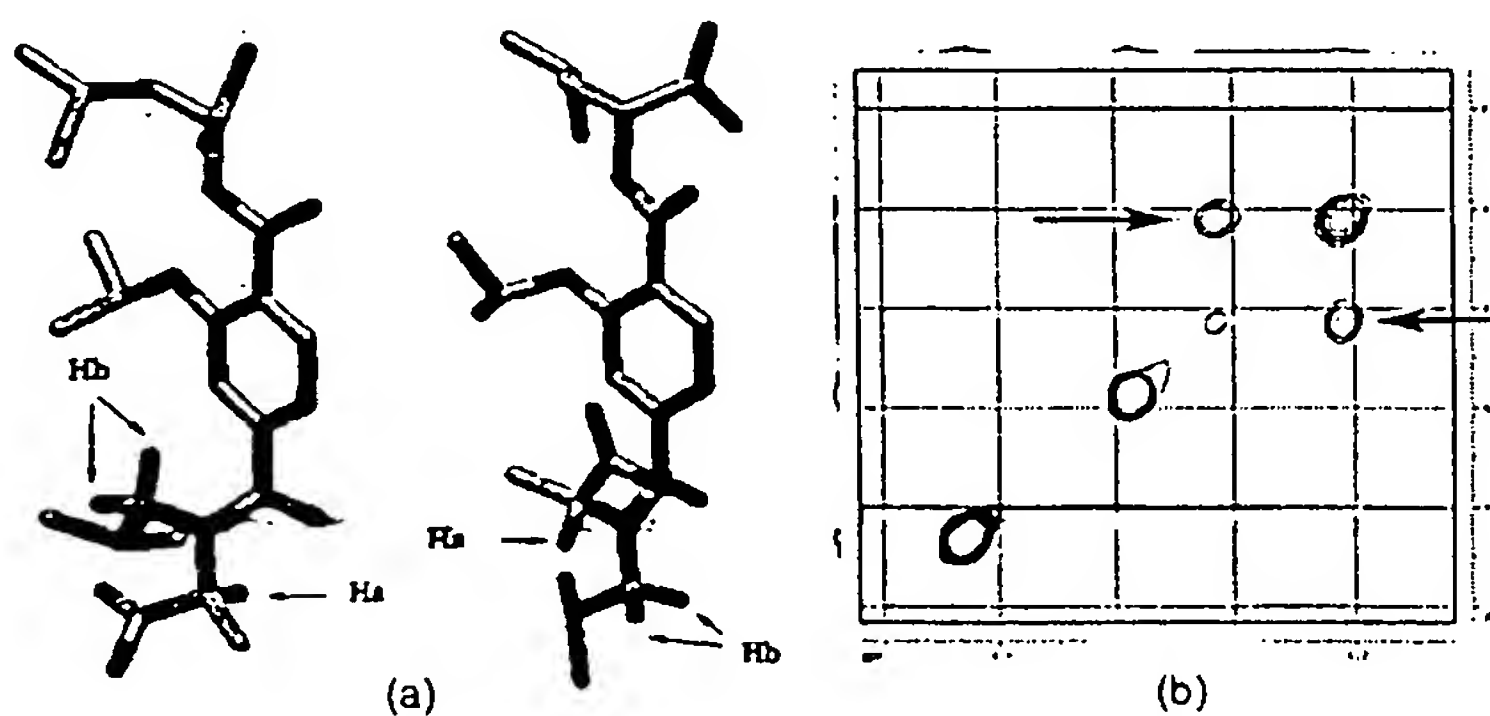
The binding affinity of the terephthalamide molecules for Bcl-xL was assessed by a fluorescence polarization assay using a fluorescently labeled 16-mer Bak-peptide (FI-GQVGRQLAIIGDDINR-CONH₂).⁵ Displacement of this probe through competitive binding of the



Scheme 1. Modular synthesis of terephthalamide derivatives 3 and 4.

Figure 2. ^1H NMR spectra (low field region) for 4 at different concentrations.

Scheme 2. Synthesis of terephthalamide derivative 5.

Figure 3. (A) Energy minimized Z - and E -isomers of 5. (B) ROESY ^1H experiments showed cross peaks corresponding to chemical exchange of H_a .

terephthalamide into the hydrophobic cleft of Bcl-xL would lead to a decrease in its fluorescence polarization, which in turn could be related to the known affinity of the 16-mer Bak peptide.¹² A series of terephthalamides with varied side chains was prepared. All the assays were carried out with 10^{-8} to 10^{-4} M terephthalamide solution in 10 mM PBS buffer (pH 7.4, 298 K) with less than 0.1% DMSO, indicating good solubility of terephthalamides in water. Figure 4 shows that terephthalamide 3 has good affinity for Bcl-xL with a K_i value of 0.78 ± 0.07 μ M. By screening compounds with a range of side chains on the upper carboxamide, we found that the isobutyl group as the upper substituent provided the best inhibition results (3, 10, 11, 12). The newly introduced stereogenic center in the terephthalamide did not affect the affinity, as seen by comparing 6 and 7. The optimal alkoxy group in the 2-position of terephthalamide was found to be isopropoxy (3, 4), which closely mimics the size of Leu⁷⁸ of the Bak peptide; both larger (8, 9) and smaller (6, 7) substituents gave decreased affinities. The *N,N*-alkyl substituents on the lower carboxamide were shown to be crucial in the interaction since most of the affinity was lost when the symmetrical isopropyl groups on the amide nitrogen were replaced by other substituents (5, 13, 14, 15). The

importance of hydrophobic side chains was further confirmed by the weak binding of 16, which lacks the key substituents. The 2-isopropylaminoterephthalamide 17 showed affinity 4-fold less than its 2-isopropoxy analogue 4, suggesting the intramolecular hydrogen bond in 4 helps to orient the side chain and in turn to enhance binding. These assay results confirmed that the terephthalamide derivatives retained the high in vitro affinity of the original terphenyl scaffold while reducing its complexity.

A computational docking study using AutodockTM lent support that the binding cleft for the BH3 domain of the Bak peptide on the surface of Bcl-xL is the target area for the synthetic inhibitors. Over 90% of the conformational search results showed the terephthalamide docked to this region. Figure 5 shows the overlay of the top-ranked docking result with the BH3 domain of the Bak peptide in the Bcl-xL/Bak complex, suggesting that the side chains of the terephthalamide scaffold have an analogous spatial arrangement to the three key alkyl side chains of the Bak peptide.

In conclusion, a novel family of Bcl-xL antagonists, based on a terephthalamide scaffold has been successfully

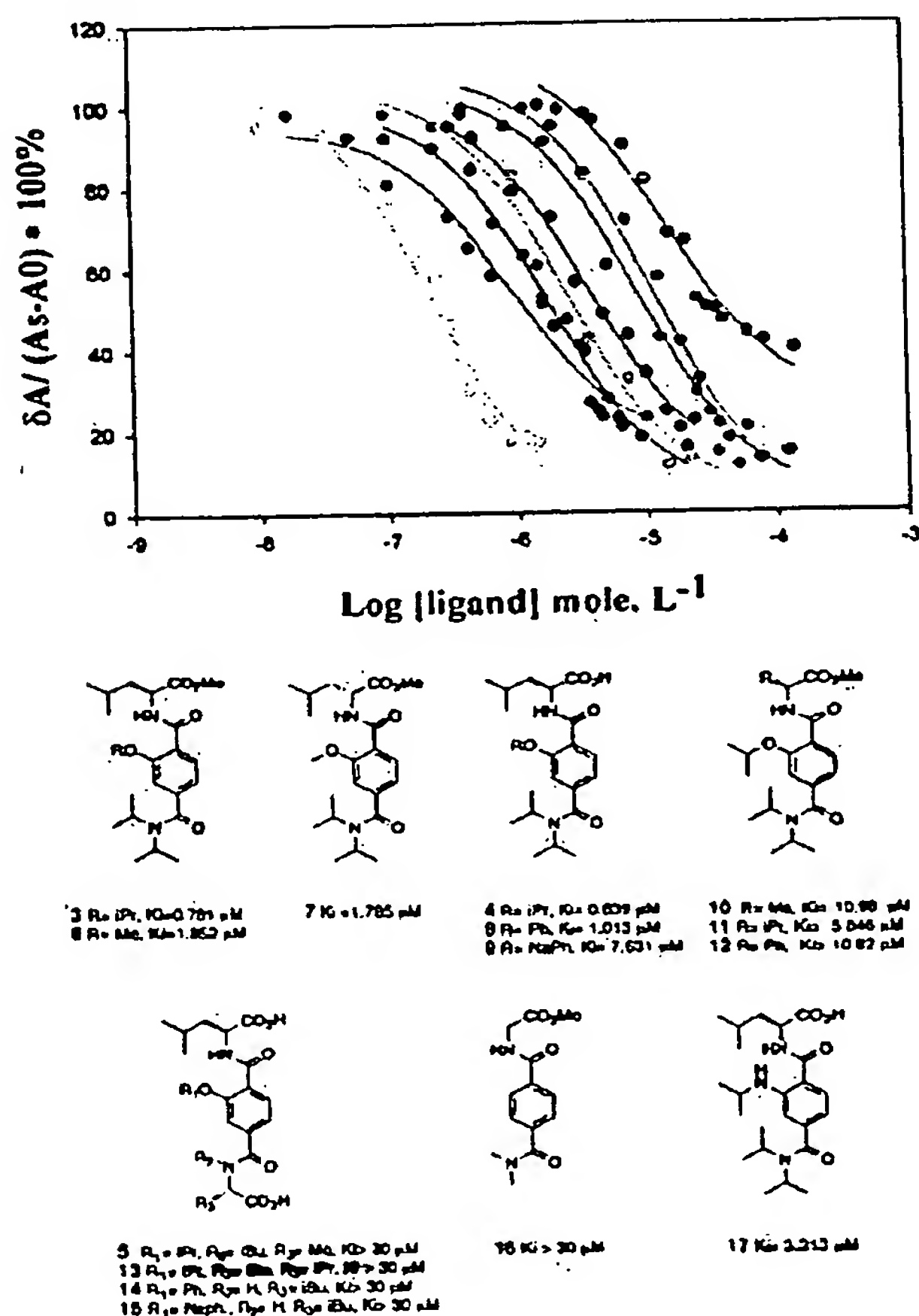


Figure 4. Results of the fluorescence polarization competition assay of terephthalamide derivatives as antagonists of Bcl-xL/Bak complex formation. Yellow, non-labeled Bak BH₃ peptide; purple, 3; light blue, 6; red, 8; brown, 9; green, 10; dark blue, 16; black, 17.

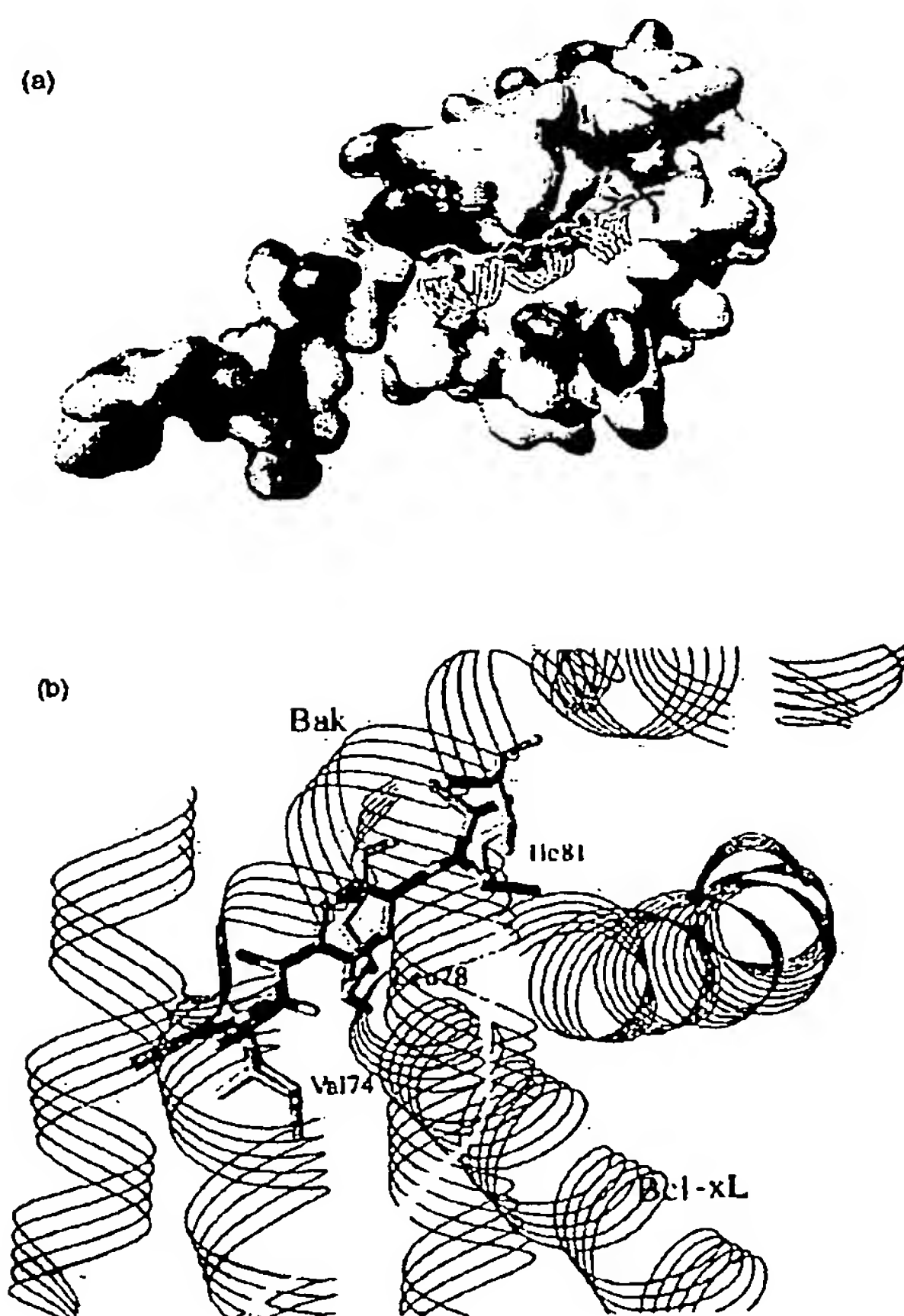


Figure 5. Results of docking studies of 6 and Bcl-xL. (A) Full view. (B) Close up of an overlay of the highest-ranked binding mode and the Bak peptide. The key hydrophobic side chains of Bak are shown as stick representations.

developed. Systematic synthesis, conformational studies and fluorescence polarization binding assays were completed and sub- μ M level in vitro affinities were observed.

Acknowledgements

We thank the National Institutes of Health for financial support of this work.

References and notes

1. (a) Adams, J. M.; Cory, S. *Science* 1998, 281, 1322. (b) Reed, J. C. *Nature* 1997, 387, 773.
2. (a) Graeber, T. G.; Osmanian, C.; Jacks, T.; Housman, D. E.; Koch, C. J.; Lowe, S. W.; Giaccia, A. J. *Nature* 1996, 379, 88. (b) Fearon, E. R.; Vogelstein, B. *Cell* 1990, 61, 759.
3. Strasser, A.; Huang, D. C. S.; Vaux, D. L. *Biochim. Biophys. Acta-Rev. on Cancer* 1997, 1333, F151.
4. Adams, J. M.; Cory, S. *Trends in Biochem. Sci.* 2001, 26, 61.
5. Sattler, M.; Liang, H.; Nettlesheim, D.; Meadows, R. P.; Harlan, J. E.; Eberstadt, M.; Yoon, H. S.; Shuker, S. B.; Chang, B. S.; Minn, A. J.; Thompson, C. B.; Fesik, S. W. *Science* 1997, 275, 983.
6. (a) Wang, J. L.; Liu, D. X.; Zhang, Z. J.; Shan, S. M.; Han, X. B.; Srinivasula, S. M.; Croce, C. M.; Alnemri, E. S.; Huang, Z. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000, 97, 7124. (b) Degterev, A.; Lugovskoy, A.; Cardone, M.; Mulley, B.; Wagner, G.; Mitchison, T.; Yuan, J. Y. *Nat. Cell Biol.* 2001, 3, 173. (c) Tzung, S. P.; Kim, K. M.; Basanez, G.; Giedt, C. D.; Simon, J.; Zimmerberg, J.; Zhang, K. Y. J.; Hockenbery, D. M. *Nat. Cell Biol.* 2001, 3, 183. (d) Enyedy, I. J.; Ling, Y.; Nacro, K.; Tomita, Y.; Wu, X. H.; Cao, Y. Y.; Guo, R. B.; Li, B. H.; Zhu, X. F.; Huang, Y.; Long, Y. Q.; Roller, P. P.; Yang, D. J.; Wang, S. M. *J. Med. Chem.* 2001, 44, 4313. (e) Lugovskoy, A. A.; Degterev, A. I.; Fahmy, A. F.; Zhou, P.; Gross, J. D.; Yuan, J. Y.; Wagner, G. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 1234.
7. Kutzki, O.; Park, H. S.; Ernst, J. T.; Orner, B. P.; Yin, H.; Hamilton, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 11838.
8. Energy minimization and compound superimpositions were carried out using the MM2 forcefield within the MacroModel program.
9. Ernst, J. T.; Becerril, J.; Park, H. S.; Yin, H.; Hamilton, A. D. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2003, 42, 535.
10. Crisp, G. T.; Jiang, Y. L. *Arkivoc* 2001, 2, U60.
11. 2-D NMR experiments were conducted with Bruker 500 Hz under following conditions: 0.1 mM 2 in DMSO at 298 K.
12. Under this assay condition, the unlabeled 16-mer Bak peptide gave a K_d of 120 nM.⁷